

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

15. 3. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 7 月 2 3 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 2 7 8 4 2 9
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 2 7 8 4 2 9]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構

REC'D 29 APR 2004

WIPO

PCT

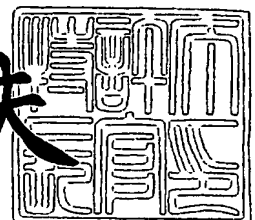
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 1 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 PS03-1322
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 2 4 条西 1 2 丁目 1 - 7 - 1 1 1 2
 【氏名】 菅原 照夫
【特許出願人】
 【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】
 【識別番号】 100087631
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 滝田 清暉
【選任した代理人】
 【識別番号】 100110249
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 下田 昭
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 011017
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列番号 1 (ヒト StAR 結合蛋白質遺伝子) の塩基配列における、その 187～205 又は 474～494 を含む連続する 23 塩基以下の塩基配列に相当するオリゴヌクレオチド、その相補的オリゴヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA。

【請求項 2】

前記 23 塩基以下の塩基配列が配列番号 1 (ヒト StAR 結合蛋白質遺伝子) の塩基配列の 187～205 又は 474～494 の塩基配列である請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド、その相補的オリゴヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド、その相補的オリゴヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA を、癌細胞へ導入することから成る、該細胞における SBP 遺伝子の発現を抑制する方法。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド、その相補的オリゴヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA を含み、該オリゴヌクレオチド、その相補的オリゴヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA を癌細胞へ導入する手段を含む癌治療用キット。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 StAR結合蛋白質(SBP)遺伝子の発現を抑制するオリゴヌクレオチド及び方法

【技術分野】

【0001】

この発明は、コレステロール輸送促進因子であるStAR蛋白質と結合し、StAR蛋白質の機能を調節するStAR結合蛋白質の産生を抑制する手段に関し、更にその機能を傷害することにより癌細胞に特異的にアポトーシスを導入する手段に関する。

【背景技術】

【0002】

StAR蛋白質(急性調節性蛋白質)はミトコンドリア外膜から内側へのコレステロールの輸送において重要な役割を演ずる(非特許文献1)。StAR蛋白質は細胞質でステロイドホルモン生成を促進すると考えられる(非特許文献2)。

一方、アポトーシスは変性したり、悪性変化した細胞を生体から除去する生体作用である。癌細胞では放射線や化学療法で生じ、癌の治療に用いられてきたが、癌細胞に対する特異性が低く、有効とはいえなかった。そのため、細胞膜を構成するコレステロールの輸送促進因子であるStAR蛋白質の機能を調節することにより、癌細胞にアポトーシスを導入することができるのではないかと考えられてきた(非特許文献3)。

なお、本発明では、細胞内にRNA断片を導入することによりその遺伝子の発現を抑制するRNA干渉技術(RNA interference)を利用した(非特許文献4、特許文献1)。

【0003】

【非特許文献1】 Endocr. Rev. 17, 221-224 (1996)

【非特許文献2】 Recent Prog Horm Res 54, 369-94 (1999)

【非特許文献3】 Proc Natl Acad Sci USA 99, 6943-6948 (2002)

【非特許文献4】 Nature, 391, 806-811 (1998)

【特許文献1】 特表2002-516062

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】**

【0004】

癌細胞は分裂増殖する速度が正常の細胞よりも早く、細胞内の物質の代謝も正常細胞に比べると早い。そのため、本発明は、細胞膜を構成するコレステロールの代謝に着目して、コレステロール輸送促進因子であるStAR蛋白質と結合し、StAR蛋白質の機能を調節する蛋白質の産生を抑制して細胞の機能を傷害することにより癌細胞に特異的にアポトーシスを導入することを目的とした。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、ステロイドホルモン産生細胞の細胞質におけるStAR蛋白質のステロイドホルモンの生成を促進する機構を研究する過程において、このStAR蛋白質と相互作用する蛋白質をスクリーニングしたところ、得られたクローンの一つが2.3 kbの挿入遺伝子を含んでおり、このクローンとStAR蛋白質が相互作用していることを確認した。この挿入遺伝子の翻訳産物はStAR蛋白質結合蛋白質(SBP、DDBJ Accession number AB112474 (80..2428), AB112475 (431..2779)、配列番号1)であることが分かった。

本発明者は、RNA干渉技術(非特許文献4、特許文献1)を利用して、このStAR結合蛋白質に特異的な遺伝子配列と相同なRNA断片を合成し、癌細胞内に導入した。その結果、StAR結合蛋白質の発現が抑制されることを確認し、更にアポトーシス細胞の出現を確認した。

【0006】

即ち、本発明は、配列番号1(ヒトStAR結合蛋白質遺伝子)の塩基配列における、その187~205又は474~494を含む連続する23塩基以下の塩基配列に相当するオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖

RNAである。この23塩基以下の塩基配列は、配列番号1の塩基配列の187～205又は474～494の塩基配列であることが好ましい。

【0007】

また、本発明は、上記オリゴヌクレオチド、その相補的オリゴヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖RNAを、癌細胞へ導入することから成る、該細胞におけるSBP遺伝子の発現を抑制する方法である。

更に、本発明は、上記オリゴヌクレオチド、その相補的オリゴヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖RNAを含み、該オリゴヌクレオチド、その相補的オリゴヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖RNAを癌細胞へ導入する手段を含む癌治療用キットである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明で用いるRNA断片としては、標的RNAのセンス又はアンチセンスのものでもよいが、これらはRNaseで容易に分解され、また効果が劣ると考えられるため、これらから成る2本鎖RNAが好ましく用いられる。この2本鎖RNAは通常センスとアンチセンスの2本を別々に合成し、それをハイブリダイズさせて2本鎖にして用いられる。

このRNA断片の長さは21～23塩基が有効と考えられているが、一般には21塩基のものが好ましく使われ、後述の実施例においても21塩基のもので有効に機能している。

本発明においては対象とする細胞はヒト等の癌細胞である。

これらのSBP遺伝子の特定の塩基配列に「相当する」オリゴヌクレオチドとは、この遺伝子が転写されて生成するmRNAの、SBP遺伝子の特定の塩基配列に相当する部分に相補的なRNAという意味であり、具体的にはこのSBP遺伝子の特定のDNA配列のTをUに置き換えたものという意味である。

RNA断片を細胞に導入する手段については、特に制限はなく、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション、ウイルスベクターを用いる方法などが挙げられるが、リポソーム等に基づく市販のトランスフェクション試薬を用いるのが簡便である。

【0009】

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

この実施例で用いたプラスミドと細胞については下記のように調整及び培養を行った。
プラスミドの構築

ヒトStAR cDNAを鋳型としてPCRで作製したEcoRI断片を、転写因子GAL4活性化ドメイン(GAD)を有するpACT2ベクター(CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)に挿入し、ミトコンドリア輸送シグナルである最初の62アミノ酸を除いて、プラスミドを構築した。このプラスミドは転写因子GAL4とミトコンドリア輸送シグナルを欠くStAR(即ち、N-62-StAR)の融合タンパク質(GAL4-N-62-StAR)を発現する。

同様に、GAL4-StAR変異体(GAL4-R193X, GAL4-Q253X, GAL4-frameshift)を作製した。

また、ヒトN-62-StAR cDNAから作製したEcoRI断片を、単純性疱疹ウイルスのVP16タンパク質由来の活性化ドメイン(AD)を有するpVP16ベクター(CLONTECH Laboratories, Inc.)に挿入し、プラスミド(pVP16-StAR)を構築した。

【0010】

また、SBP cDNAのEcoRI/BamHI断片を、GAL4 DNA結合ドメイン(DNA-BD)を有するpMベクター(CLONTECH Laboratories, Inc.)に挿入し、プラスミド(pM-SBP)を構築した。

更に、SBPのEcoRI/BamHI断片をpVP16ベクター(CLONTECH Laboratories, Inc.)に挿入し、プラスミド(pVP16-SBP)を構築した。

pM-StARプラスミドを作製するために、N-62-StARのEcoRI断片をクローニングしてpMベクター(CLONTECH Laboratories, Inc.)に挿入した。

PG5luc(Promega Corp., Madison, WI)はCAT遺伝子又はルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして含む。RACEの結果、精巣cDNAからPCRで得た完全コード領域のEcoRI断片をpTar

getベクター(Promega Corp.)に挿入し、発現プラスミド(pSBP)を得た。

これらのプラスミドはQiagen Maxiprep システム(QIAGEN, Hilden, Germany)を用いてトランスフェクトした。

【0011】

細胞培養

COS-1細胞及びヒトG2細胞は理研細胞バンクから入手した。ヒト副腎皮質癌腫H295R細胞は大阪大学岡本博士から得た。ヒトMCF-7肺癌細胞はATCC (Manassas, VA)から得た。ヒト顆粒層様腫瘍KGN細胞は九州大学西博士から得た。

COS-1細胞は35mmプラスチック皿で増殖し、10%胎児ウシ血清及び50 μ g/mlのゲンタマイシンを添加したDMEM培地で培養した。

KGN細胞は10%胎児ウシ血清及び50 μ g/mlのゲンタマイシンを含むDMEM/F12培地で培養した。

H295R細胞は2%ULTROSER G(BioSeptra, Cergy-Pontoise, France)及び1%ITS Premix(Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ)を含むDMEM/F12培地で培養した。

【実施例1】

【0012】

本実施例では、GAL4ベースの酵母2ハイブリッドシステムを用いて、StARタンパク質と相互作用するタンパク質を特定した。

酵母2ハイブリッド相互作用スクリーニングは以下のようにして行った。

ヒト精巣cDNAを組み込んだpACT2プラスミドと、転写因子GAL4とミトコンドリア輸送シグナルを欠くStAR(即ち、N-62-StAR)の融合タンパク質(GAL4-N-62-StAR)を発現するレポーター遺伝子を酵母株CG-1945に導入した(MAT α , ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, LYS2::GALLUAS-GALLTATA-HIS3, URA3::GAL417-mers(x3)-CYC1TATA-lacZ)(MATCHMAKER Two-Hybrid System 2, CLONTECH)。1 $\times 10^6$ 形質転換株を、ヒスチジン、ロイシン及びトリプトファンを欠く選択的合成培地(SD)で、30℃で5日間培養した。全酵母DNAを大腸菌株HB101にエレクトロポレーションにより導入し、ロイシンを欠くM9培地で選択した後、全てのHIS⁺及びLacZ⁺クローンからプラスミドDNAを単離した。

【0013】

その結果、9クローンが得られた。DNAシーケンスとデータベース分析から、これらのクローンは3つのグループに分けられることが分かった。即ち、表1に示すように、 α ヘリックスコイルドコイルロッドホモログ(HCR, accession NM019052)、rabaptin-5(RAB5EP, accession NM 004703)、及び nucleobindin 2 (NUCB2, accession NM 005013)である。HECとNUCB2はLacZ表現型を発現する。これらのクローンにコードされるタンパク質の細胞間局在予想から、クローン4を選択して分析した。

その結果、クローン4は推定細胞質タンパク質をコードする2.3Kbの挿入遺伝子を含み、657アミノ酸から成るタンパク質をコードする1972ntのオープンリードフレームと3末端に62ntの未翻訳配列を有することが分かった。

【0014】

【表 1】

Clone	Insert size (kb)	Identity	Colony color
1	-	-	
4	2.3	HCR	positive
5	2.2	HCR	positive
11	3.8	RAB5EP	negative
26	2.6	NUCB2	positive
36	0.8	HCR	negative
44	-	-	
45	4.3	RAB5EP	negative
49	2	HCR	positive

【実施例 2】

【0015】

本実施例では、インビボでStARタンパク質とクローン4の相互作用を調べるために、GAD-クローン4融合タンパク質を発現するプラスミド及びGAL4-N-62-StARとGAL4-StAR変異体融合タンパク質を発現するプラスミドを調べた。

この検査には、MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3::GAL417-mers(x3)-CyClTATA-lacZの遺伝子型を持つ酵母株Y187 (CLONTECH Laboratories, Inc.)を用いた。プラスミドGAL4及びGAD融合構築物によりY187株を形質転換した。この形質転換体をロイシン及びトリプトファンを欠く選択培地(SD)で30℃で5日間培養した。X-galフィルター検査を用いて、 β ガラクトシダーゼ活性を決定した。

【0016】

クローン4をGAL4に融合させたリバースコンビネーションとN-62-StARをGADに融合させたリバースコンビネーションを用いてトランスフェクトを行った結果は、表2に示すように、StARとクローン4ハイブリッドベクターでトランスフェクトした酵母はLacZ表現型を示したが、StAR変異体とクローン4ハイブリッドベクターでトランスフェクトした酵母はLacZ表現型を示さなかった。このことは、酵母の中でN-62-StARがクローン4と相互作用していることを示している。

【0017】

【表 2】

DNA-BD	AD	LacZ Phenotype
GAL4	GAD	white
GAL4-N-62-StAR	GAD-Clone 4	blue
GAL4-Clone4	GAD-N-62-StAR	weak blue
GAL4-R193X	GAD-Clone 4	white
GAL4-Q258X	GAD-Clone 4	white
GAL4-Frameshift	GAD-Clone 4	white

【実施例 3】

【0018】

本実施例では、StARタンパク質とクローン4の直接相互作用を調べるために、プルダウン評価を行った。プルダウン評価は以下の手順で行った。

PCRで得たEcoRI断片をpCIベクター(Promega Corp.)に挿入し、プラスミド発現クローン作製した。T7 RNAポリメラーゼに基づくTNT-結合網状赤血球溶解システム(Promega Corp.)を用いて、翻訳タンパク質をインビトロで合成した。StAR cDNAを鋳型として用いたPCRにより得たEcoRI断片を、C末端にHisタグ(Novagen, San Diego, CA)を有するpET38bに挿入して、Hisタグを付したCBD-N-62-STAR融合タンパク質(62アミノ酸末端を欠く)を発現するプラスミドを構築した。CBDはCellulose Binding Domain 配列であってセルロースに特異的に結合する性質を有しており、融合蛋白質をセルロースやキチンなどの不活性な担体に化学的に修飾を行うことなく、固定化させることができる。

His結合樹脂(Novagen)に結合したHisタグを付したN-62-STAR融合タンパク質を、250 μ lの緩衝液(50mM potassium phosphate, pH 7.4, 150mM KCl, 1mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Triton-X)中で35Sメチオニンでラベルされた翻訳クローン50 μ lと共に、3時間インキュベートした。樹脂をマイクロ遠心分離で集めて3回洗浄した。洗浄したビーズは20 μ lの2 \times SDSサンプル緩衝液に懸濁し、5分間加熱し、ペレット化して、その上澄みをSDS-PAGEとオートラジオグラフにかけた。

【0019】

その結果を図1に示す。クローン4の翻訳されたタンパク質がCBD-N-62-StAR融合タンパク質とは相互作用するが、CBDとは相互作用しないことが分かった。このクローン4をStAR結合タンパク質(SBP)と呼ぶ(DDBJ Accession number AB112474 (80..2428), AB112475 (431..2779)、配列番号1)。

【実施例4】

【0020】

本実施例では、SBPの発現をノーザンプロット解析で調べた。

ノーザンプロットは、それぞれ2 μ gのポリAと各組織から単離されたRNAについて、プローブにSBPと β アクチンcDNAを用いて行った。SBP遺伝子の発現は試験した全ての組織で検出された。その発現レベルは、図2に示すように、転写産物が2.4kb又は3.8kbのサイズの組織に顕著に高かった。

種々の細胞ラインでSBPの発現を調べるために、HepG2細胞(ヒトの肝細胞癌)、KGN細胞(ヒトの顆粒膜細胞癌)、H295R細胞(ヒトの副腎癌細胞)及びMCF-7細胞(ヒトの乳がん細胞)から抽出されたmRNAを用いてRT-PCRを行った。

【0021】

RT-PCRは以下の手順で行った。

用いたmRNAは、Hep G2細胞、KGN細胞、H295R細胞、MCF-7細胞から単離された。相補的DNAの合成は、150 pmol のオリゴ dTをプライマーとして用い、1 μ g 全RNA及び200ユニットのSUPERScript II Rnase H (Life Technologies, Inc./BRL, Washington, DC)を用いて、37℃で60分間行った。逆転写酵素を含む反応溶液20 μ lは、50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 20mM dithiothreitol 及び各0.5mMのdATP, dCTP, dGTP, 及びdTTPを含む。次に、プライマーとして配列番号2及び配列番号3の合成オリゴヌクレオチドを用いて、SBPを増幅した。このPCR反応溶液(50 μ l)は、10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs 及び10 pmolの各プライマーを含む。PCT反応は、94℃で45秒間の変性、55℃で45秒間の2次アニール、及び72℃で1分間の延長から成るサイクルを35サイクル行った。

【0022】

その結果、図3に示すように、全ての細胞ラインから増幅産物(400bp)が得られた。

以上から、SBP遺伝子は、H395R細胞やKGN細胞などステロイドホルモンを産生する細胞に発現することが分かった。

【実施例5】

【0023】

本実施例では、ステロイド生成にSBPがどのような影響を持つかについて調べた。

COS-1細胞を、F2、シトクロムP450コレステロール側鎖切断システム(Dr Walter L Miller of the University of California)、pStAR(pSPORT StAR CDNA) 及びFuGENE 6を用いたpSBPで共トランスフェクトした。細胞(F2/StAR/SDP)はトランスフェクト後48時間インキュベートした。いくつかの培養皿を、最後の24時間の培養の際に、22R-hydroxy-cholesterolで処理した。トランスフェクションの48時間後に、培地を回収し、プレグネノロンのイムノアッセイを行った。このアッセイの結果は、トランスフェクションの効率のばらつきを是正するため、22R-hydroxy-cholesterolを有する培養物によって生成する血清プレグネノロン濃度で標準化した。各評価は3回繰り返した。

その結果を図4に示す。共トランスフェクトしたCOS-1細胞(F2/StAR/SDP)によって生産されるプレグネノロン(pregnenolone)の量は、F2、StAR又は空のベクターでトランスフェクトした細胞(F2/StAR)によって生産されるプレグネノロンの量の138%であった。

【実施例6】

【0024】

本実施例では、RNA干渉によりSBPの発現を抑制し、ステロイドホルモンを検査した。SBP遺伝子における2つの標的配列を選択し、SiRNAの効果をRT-PCRで測定した。

RNA干渉は以下の手順で行った。

副集密的(40~50%集密的)なH295細胞とKGN細胞の培養物を35mm皿に、それぞれ細胞数が同じになるようにまく。これら細胞の内因性のSBP mRNAを標的として、19ヌクレオチド重鎖(siRNA-SBP-I)と21ヌクレオチド重鎖(siRNA-SBP-II)を加えて形質転換した(Dharmacon, Inc., Lafayette, CO)。これらの重鎖RNAは、それぞれSBP(配列番号1)の開始コドンの下流187と474のヌクレオチドを標的としている。

siRNAはリボオリゴヌクレオチドペアSBP-IとSBP-IIを用いて構成された。SBP-Iは、5'-CGGGAUGUUUCCAGUGACAdTdT-3'(配列番号4)及び5'-UGUCACUGGAAACAUCGCGdTdT-3'(配列番号5)、SBP-IIは5'-GAACUUGGAAGAGGGGAGGCAdTdT-3'(配列番号6)及び5'-UGCCUCCCCUCUUC CAAGUUCdTdT-3'(配列番号7)である。更に、コントロールとして、5'-GCGCGCUUUGUAGGAU UCGdTdT-3'(配列番号8)と5'-CGAAUCCUACAAAGCGCGCdTdT-3'(配列番号9)の、スクランブルリボオリゴヌクレオチドペア(siRNA-scramble)を用いた。

【0025】

これらのオリゴヌクレオチドはDharmaconプロトコルに従ってアニールした。300pmolの各二重鎖を15 μ lのmetafectene(Biontex Laboratories GmbH, Munich, Germany)を用いて、製造業者の指示に従って、細胞に導入した。H395R細胞の皿は、トランスフェクション後に3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 β -HSD)の酵素活性を抑制するために、15 μ Mのtriestane(持田製薬)を用いて6時間処理した。3 β -HSDはプレグネノロン(pregnenolone)をプロゲステロン(progesterone)に形質転換する。トランスフェクションの48時間後に、細胞を集めて、ステロイドホルモンのラジオイムノアッセイを行った。全RNAは抽出され、GAPDH用のプライマー(sense: 配列番号10; antisense: 配列番号11)を用いて、RT-PCRを行った。

【0026】

結果を図5と図6に示す。

細胞をDsRNAでトランスフェクトした後、siRNA-SBP-I又はsiRNA-SBP-IIで処理されたH295R細胞(siRNA-SBP-Iで処理した場合85 \pm 5.0ng/dish及びsiRNA-SBP-IIで処理した場合66 \pm 8.2ng/dish)により生産されるプレグネノロンの量は、図5に示すように、スクランブルsiRNAによりトランスフェクトしたH295R細胞により生産されるプレグネノロンの量の、それぞれ56.5%及び37.5%であった。

siRNA-SBP-I又はsiRNA-SBP-IIで処理されたKGN細胞によって生産されるプレグネノロンの量は、図6に示すように、スクランブルsiRNAによりトランスフェクトしたKGN細胞により生産されるプレグネノロンの量の、それぞれ71%及び55%であった。

SBP遺伝子の発現レベルは、siRNA-SBP-IとsiRNA-SBP-IIのいずれにおいても減少していた。これは、SBP遺伝子の標的配列をSiRNA処理することによって、SBP遺伝子の発現が減

少しした結果、ステロイドホルモンの生産量が減少したことを示している。

【実施例 7】

【0027】

本実施例では、副腎癌細胞H295R 細胞を用いて、アポトーシス細胞の出現を確認した。H295R細胞は2%の ULTROSER G (BioSeptra社) と1%の Premix(ベクトン ディキンソン社)を含んだ 培養液DMEM/F12で培養した。遺伝子導入する前日に径35ミリのプラスチック製の培養皿に24mm×24ミリメートルのカバーガラスを敷き、その上に細胞がコンフルエンス(40-50%)となるようにサブカルチャーした。SBP mRNAの発現を抑制するために、metafectene を用いて、siRNA-I又はsiRNA-IIを遺伝子導入した。遺伝子導入後24時間培養したのち、培養細胞を4%のホルムアルデヒド燐酸緩衝生理食塩液で30分間固定した。アポトーシス細胞の検出には、DeadEnd Fluorometric TUNEL システム (Promega 株式会社)を用い、方法はシステムのプロトコルに従った。燐酸緩衝生理食塩水で2回洗浄したのち、カバーガラスの裏側をスライドガラスにのせ、顕微鏡で観察した。観察は450-490nmの励起波長と吸収フィルター515-565nmの条件で蛍光顕微鏡観察した(Axiophot、カール Zeiss 社)。蛍光を発した細胞はDNAが断片化したアポトーシス細胞である。デジタルのカメラ(DXM 1200、ニコン社)を顕微鏡に付け、画像を撮影した。撮影した画像はアドービ・フォトショップ5.0(アドービシステム社)を用いて、画像処理した。画像の倍率は400倍である。

siRNA-SBP IIを遺伝子導入した結果を図7(B)に示す。siRNA-SBP II導入によりアポトーシス細胞の出現が認められる。

【産業上の利用可能性】

【0028】

本発明のsiRNA及びこれを用いた方法は、固形癌：上皮性癌(胃がん、肺癌、肝臓がん、すい臓癌など)、非固形癌：白血病、悪性リンパ腫、悪性肉腫(骨肉腫、線維肉腫など)の抗癌剤および抗悪性腫瘍剤、ステロイドホルモン依存性悪性腫瘍のホルモン療法(乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、卵巣癌など)、エストロゲン依存性の良性疾患の治療薬(子宮内膜症、子宮筋腫など)、精子成熟の促進や抑制、排卵誘発剤、避妊薬、思春期早発症の治療、性同一性障害の治療等に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】 StAR蛋白質とクローン4のブルダウンアッセイの結果を示す図である。

【図2】 ヒト組織におけるSBP遺伝子発現を示す図である。

【図3】 種々の細胞株におけるSBP遺伝子発現を示す図である。HepG2はヒトの肝癌細胞、KGNはヒトの顆粒膜癌細胞、H295Rはヒトの副腎癌細胞、MCF-7はヒトの乳がん細胞を示す。

【図4】 ステロイド生成に対するSBPの効果を示す図である。値はチトクロームP450sccシステムとSBPを0.05 μ gを共導入したプレグネノロンの産生量の増加量で表した。

【図5】 siRNA-SBP-I及びsiRNA-SBP-IIで処理したH295R細胞により生産されるプレグネノロンの量を示す図である。

【図6】 siRNA-SBP-I及びsiRNA-SBP-IIで処理したKGN細胞により生産されるプレグネノロンの量を示す図である。

【図7】 siRNA(SBP II)の導入によるアポトーシス細胞の出現を示す図である。Aは、siRNA-Scramble、Bは、siRNA-SBP IIを遺伝子導入したもの、Cは、BをDNAase処理したものを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation
 <120> StAR結合蛋白質(SBP)遺伝子の発現を抑制するオリゴヌクレオチド及び方法
 <130> PS03-1322
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 2349
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

atgtttccac	cttcagggtc	cactgggctg	attccccctt	cccactttca	agctcggccc	60
ctttcaactc	tgccaagaat	ggctcccacc	tggtctctcag	acattcccct	ggtccaaccc	120
ccaggctatc	aagatgtctc	agagaggcgg	ctagacaccc	agagacctca	agtgaccatg	180
tgggaacggg	atgtttccag	tgacaggcag	gagccagggc	ggagaggcag	gtcctggggg	240
ctggaggggg	cacaggccct	gagccagcag	gctgagggtga	tcgttcggca	gctgcaagag	300
ctgcggcggc	tggaggagga	ggtccggctc	ctgcggggaga	cctcgctgca	gcagaagatg	360
aggctagagg	cccaggccat	ggagctagag	gctctggcac	gggcggagaa	ggccggccga	420
gctgaggctg	agggcctgcg	tgctgctttg	gctggggctg	aggttgccg	gaagaacttg	480
gaagagggga	gccagcggga	gctggaagag	gttcagaggc	tgcaccaaga	gcagctgtcc	540
tctttgacac	aggctcacga	ggaggctctt	tccagtttga	ccagcaaggc	tgagggttg	600
gagaagtctc	tgagtagtct	ggaaaccaga	agagcagggg	aagccaagga	gctggccgag	660
gctcagaggg	aggccgagct	gcttcggaag	cagctgagca	agaccagga	agacttgag	720
gctcaggtga	ccctggttga	gaatctaaga	aaatatgttg	gggaacaagt	cccttctgag	780
gtccacagcc	agacatggga	actggagcga	cagaagcttc	tggaaaccat	gcagcacttg	840
caggaggacc	gggacagcct	gcatgccacc	gcggagctgc	tgcaggtgcg	ggtgcagagc	900
ctcacacaca	tcctcgccct	gcaggaggag	gagctgacca	ggaaggttca	accttcagat	960
tccttgagc	ctgagtttac	caggaagtgc	cagtccctgc	tgaaccgctg	gcgggagaag	1020
gtgtttgccc	tcatggtgca	gctaaaggcc	caggagctgg	aacacagtga	ctctgttaag	1080
cagctgaagg	gacaggtggc	ctcactccag	gaaaaagtga	catcccagag	ccaggagcag	1140
gccatcctgc	agcgatccct	gcaggacaaa	gccgcagagg	tggaggtgga	gcgtatgggt	1200
gccaaaggcc	tgcagttgga	gctgagccgt	gctcaggagg	ccaggcgtca	gtggcagcag	1260
cagacagcct	cagccgagga	gcagctgagg	cttgtgtgca	atgctgtcag	cagctctcag	1320
atctggctcg	agaccacat	ggctaagggtg	gaaggggctg	ccgcccagct	tcccagcctc	1380
aacaaccgac	tcagctatgc	tgtccgcaag	gtcctcacca	ttcggggcct	gattgtctga	1440
aagcttgccc	ttgctcagct	gcgccaggag	agctgtcccc	taccaccacc	ggccacagat	1500
gtgagccttg	agttgcagca	gctgcgggaa	gaacggaacc	gcctggatgc	agaactgcag	1560
ctgagtgcce	gcctcatcca	gcaggagggtg	ggccgggctc	gggagcaagg	ggaggcagag	1620
cggcagcagc	tgagcaagggt	ggcccagcag	ctggagcagg	agctgcagca	gacccaggag	1680
tccttggtta	gcttggggct	gcagctggag	gtagcacgcc	agggccagca	ggagagcaca	1740
gaggaggctg	ccagtctgcg	gcaggagctg	acccagcagc	aggaactcta	cgggcaagcc	1800
ctgcaagaaa	aggtggctga	agtggaaact	cggctgcggg	agcaactctc	agacacagag	1860
aggaggctga	acgaggctcg	gagggagcat	gccaaaggccg	tgggtctcctt	acgccagatt	1920
cagcgcagag	ccgcccagga	aaaggagcgg	agccaggaac	tcaggcgtct	gcaggaggag	1980
gcccgggaagg	aggaggggca	gcgactggcc	cggcgcttgc	aggagctaga	gagggataag	2040
aacctcatgc	tggccacctt	gcagcaggaa	ggtctcctct	cccgttacia	gcagcagcga	2100
ctgttgacag	ttcttccttc	cctactggat	aagaagaaat	ctgtggtgtc	cagccccagg	2160
cctccagagt	gttcagcatc	tgcacctgta	gcagcagcag	tgccaccag	ggagtccata	2220
aaagggtccc	tctctgtcct	gctcgatgac	ctgcaggacc	tgagtgaagc	catttccaaa	2280

gaggaagctg tttgtcaagg agacaacctt gacagatgct ccagctccaa tccccagatg 2340
agcagctaa 2349

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

acttggaggc tcaggtgacc c

21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

ttcctggagt gaggccacct

20

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 4

cgggauguuu ccagugaca

19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 5

ugucacugga aacaucccg

19

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 6

gaacuuggaa gaggggaggc a

21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 7

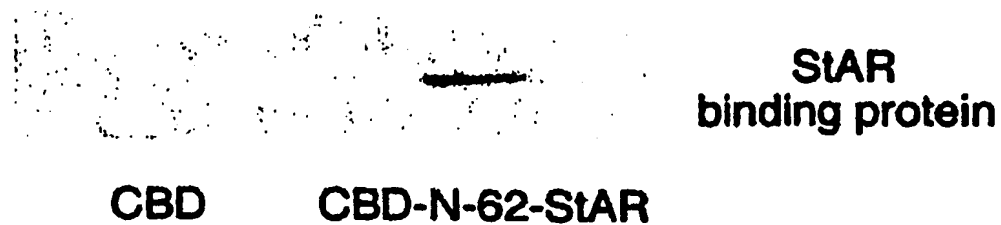
ugccucccu cuccaaguu c

21

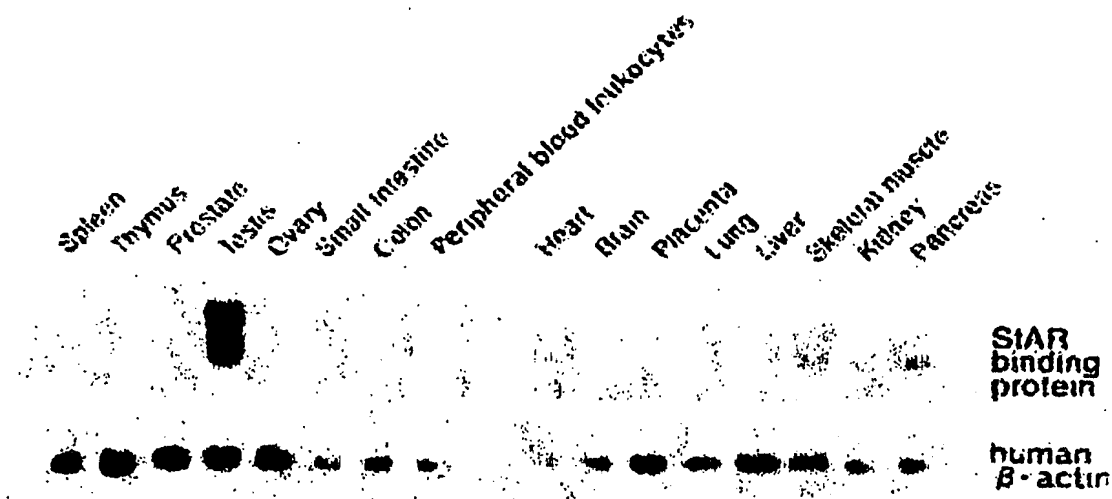
<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> siRNA
<400> 8
gcgcgcuuug uaggauucg 19
<210> 9
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> siRNA
<400> 9
cgaauccuac aaagcgcgc 19
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 10
tgccgtctag aaaaacctgc 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 11
accctgttgc tgtagccaaa 20

【書類名】 図面

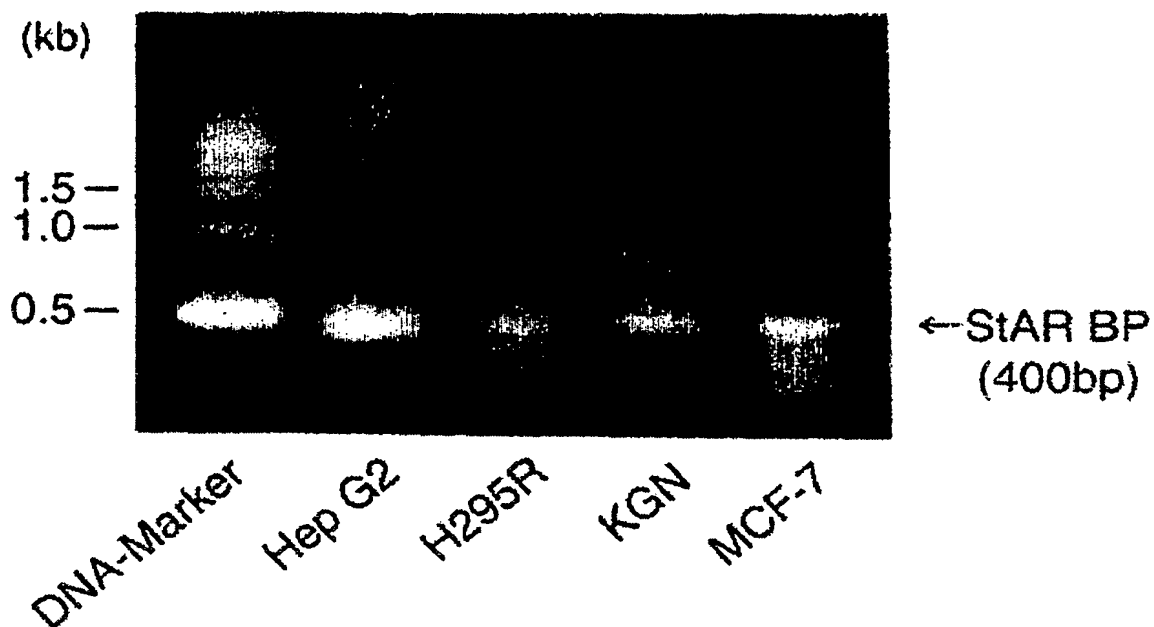
【図 1】



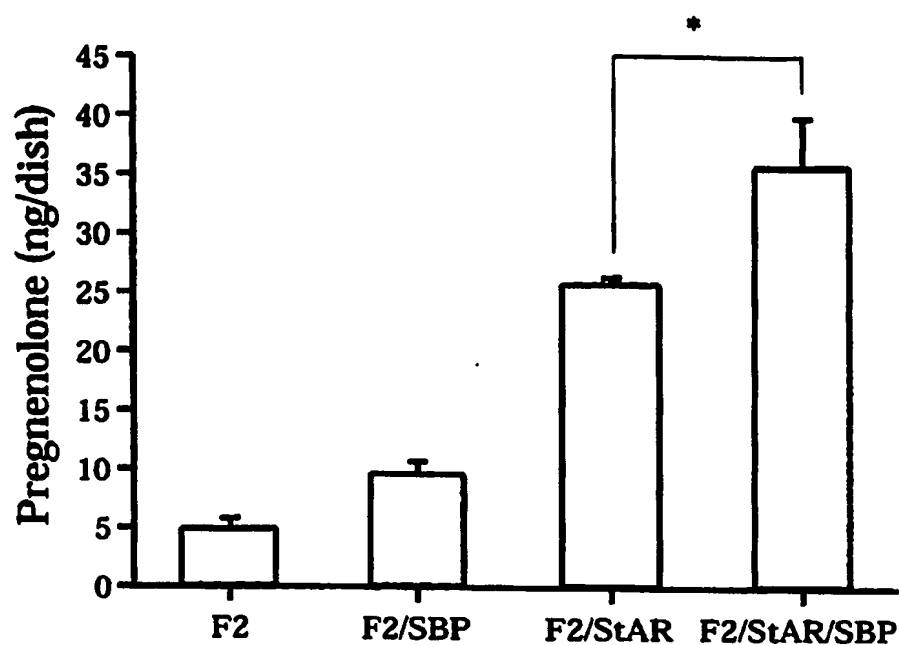
【図 2】



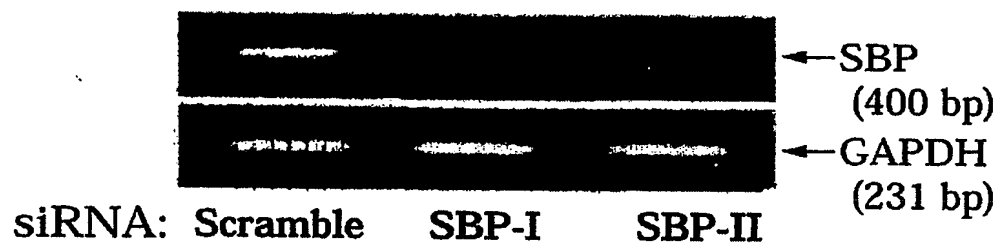
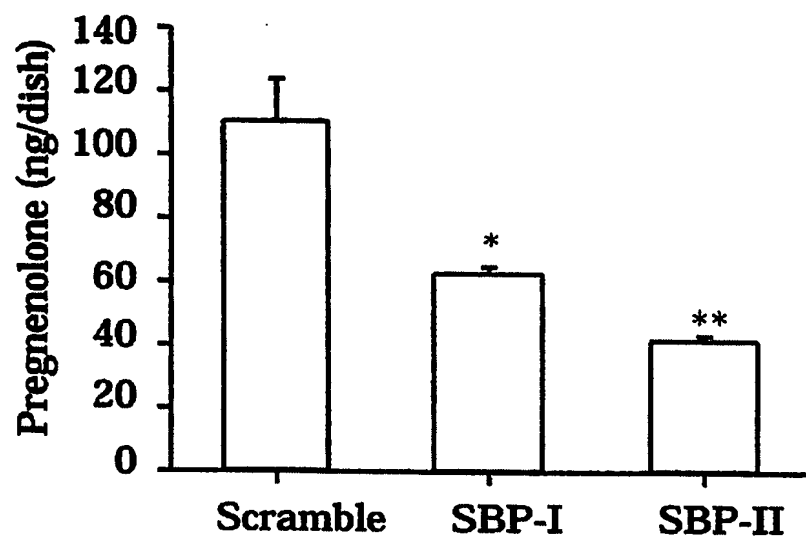
【図 3】



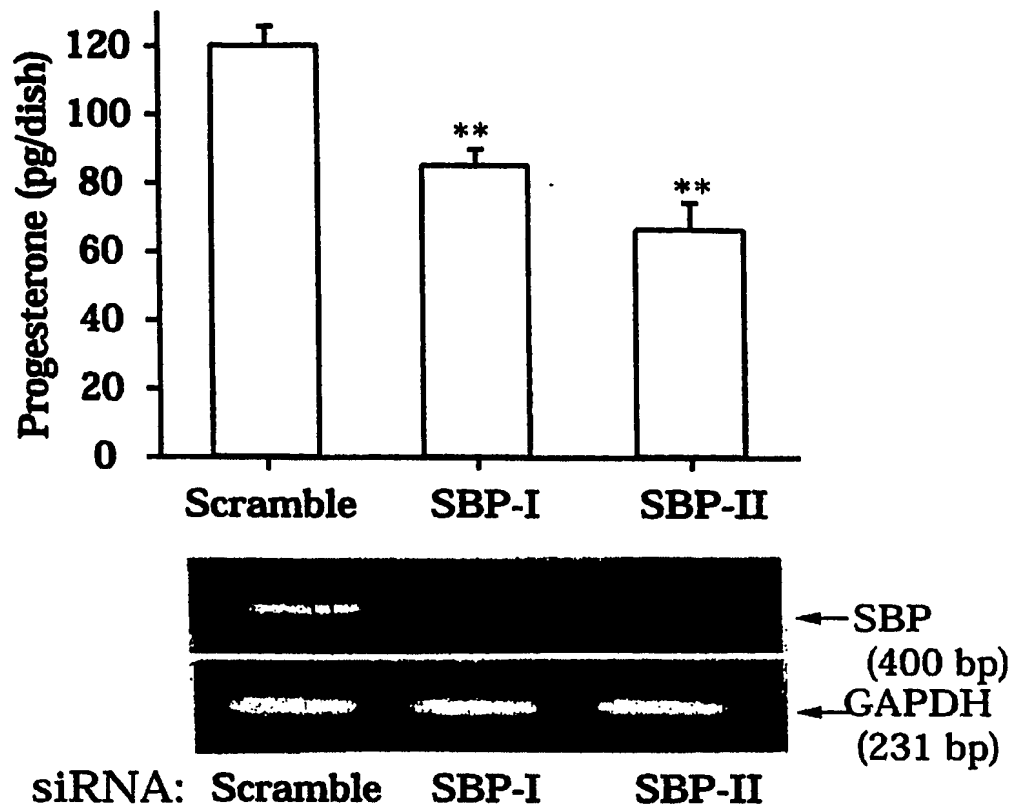
【図4】



【図5】



【図6】

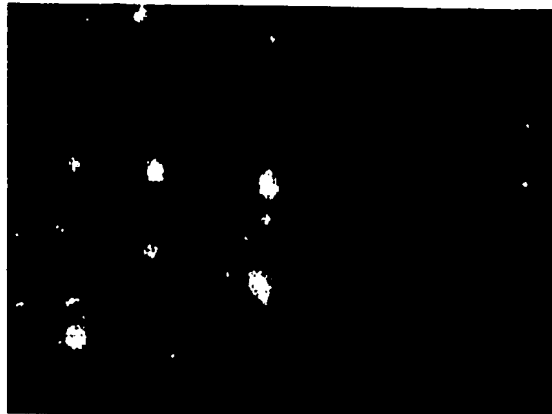


【図 7】

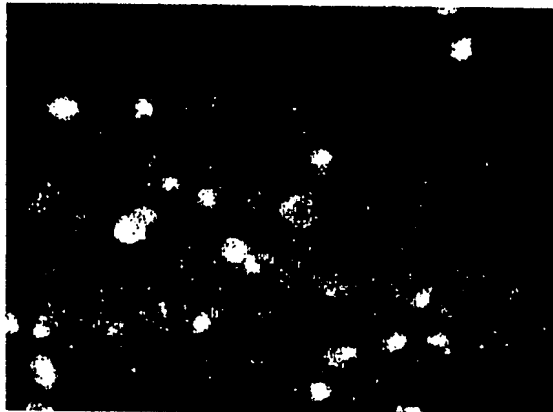
A



B



C



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 コレステロール輸送促進因子であるStAR蛋白質と結合し、StAR蛋白質の機能を調節するStAR結合蛋白質の産生を抑制する手段に関し、更にその機能を傷害することにより癌細胞に特異的にアポトーシスを導入する。

【解決手段】 S t A R 蛋白質と相互作用する蛋白質を見出し、このStAR結合蛋白質 (SBP) に特異的な遺伝子配列と相同なRNA断片を合成し、癌細胞内に導入した。その結果、StAR結合蛋白質の発現が抑制されることを確認し、更にアポトーシス細胞の出現を確認した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-278429
受付番号	50301216333
書類名	特許願
担当官	第七担当上席 0096
作成日	平成15年 7月24日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 7月23日
-------	-------------

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-278429
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒1 0 2 - 8 6 6 6 東京都千代田区四番町 5 - 3 独立行政法
人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 0
3 - 5 2 1 4 - 8 4 8 6 FAX 0 3 - 5 2 1 4 - 8 4 1 7

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成1 5 年1 0 月3 1 日付提出の特第許3 4 6 9 1 5 6 号にかか
る一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成1 5 年1 0 月3 1 日付提出の特第許3 4 6 9 1 5 6 号にかか
る一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 3 - 2 7 8 4 2 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2 0 0 3 - 2 7 8 4 2 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.